

REC'D 01 JUL 2003

WIPO

PCT



PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:

102 08 949.3

Anmeldetag:

28. Februar 2002

Anmelder/Inhaber:

Dr. Gerold Lukowski, Greifswald/DE;
Dr. Wolf-Dieter Jülich, Greifswald/DE;
Prof. Dr. Ulrike Lindequist, Greifswald/DE.

Bezeichnung:

Wirkstoffbeladene Mikro- und Nanopartikeln
aus lipidhaltigen marinen Organismen, deren
Herstellung und Verwendung

IPC:

C 12 N 1/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 18. Juni 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Dzierzon



Wirkstoffbeladene Mikro- und Nanopartikeln aus lipidhaltigen marinen Organismen, deren Herstellung und Verwendung

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Partikeln aus Biomassen mariner Organismen (Mikro- und Makroalgen, Thraustochytriden, marine Bakterien), die einen mittleren Durchmesser von 10 nm bis 10µm aufweisen, ihre Dispersion in wässrigem Medium, ein Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung. Die mittlere Teilchengröße der Partikeln aus Algenbiomassen liegt überwiegend im Bereich von 100 bis 2000 nm. Die feste Bioalgenmatrix ermöglicht den Schutz des inkorporierten Wirkstoffes vor chemischer Zersetzung und eine verzögerte Freigabe des Wirkstoffes. Durch Wahl geeigneter Tenside, Temperaturen und Wirkstoffe ist aber auch eine beschleunigte Freisetzung der Wirkstoffe von der Partikeloberfläche möglich. In Vivo-Versuche zeigen, dass eine deutlich bessere Bioverfügbarkeit der neuartigen Substanzen gegenüber den reinen Stoffen beobachtet werden konnte. Im Gegensatz zu Polymernanopartikeln sind Algenbiomassepartikeln vollständig bioabbaubar.

EINLEITUNG

Marine Lebewesen, insbesondere Mikro- und Makroalgen, marine Pilze (Thraustochytriden) und marine Bakterien, zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an Lipiden und eine spezifische Lipidzusammensetzung aus (Lindequist, U. and Th. Schweder: Marine Biotechnology, in: Biotechnology. 2. ed., Ed. H.-J. Rehm Wiley-VCH Weinheim 2001, pp. 442-473).

So können z.B. Mikroalgen unter wachstumslimitierten Bedingungen, besonders unter N-Limitierung, bis zu 70 % des assimilierten Kohlenstoffs als energetisch effiziente Lipide speichern. Gehalt und Zusammensetzung der Lipide können durch die Wachstumsbedingungen beeinflusst werden. Während höhere Pflanzen vorwiegend Lipide mit relativ kurzkettigen Fettsäuren (C12-C18) und einer geringen Anzahl von Doppelbindungen (bis C18:3) produzieren, ist die Variabilität der von marinen Organismen gebildeten Fettsäuren ungleich höher. Algen synthetisieren zahlreiche

mehrfach ungesättigte C16-C22-Fettsäuren, z.B. Linolsäure (C18:2), Linolensäure (C18:3), Arachidonsäure (C20:4), Eicosapentaensäure (EPA, C20:5) und Docosahexaensäure (DHA, C22:6) (Pohl, P. und F. Zurheide: Fatty acids and lipids of marine algae and the control of their biosynthesis by environmental factors. In: Marine Algae in Pharmaceutical Science. Ed. H.A. Hoppe, T. Levring, Y. Tanaka, Walter de Gruyter New York, 1979, pp. 473-523; Roessler, P.G.: Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions. J. Phycology 26, 393-399, 1990; Puls, O.: Biotechnology with cyanobacteria and microalgae, in: Biotechnology, 2. ed., Ed. H.-J. Rehm Wiley-VCH Weinheim 2001, pp. 105-136, Servel, M.O., C. Claire, A. Derrien, L. Ciffard, Y. De Roeck-Holtzhauer: Fatty acid composition of some marine microalgae. Phytochemistry 36, 691-693, 1994). Die heterotrophe Mikroalge *Cryptocodinium cohnii* kann bis zu 13 % ihrer Zellmasse als Lipide mit 36-43% DHA bilden (DeSwaaf, M.E., DeRijk, T.C., Eggink, G., Sijtsma, L.: Optimisation of docosahexaenoic acid production in batch cultivations by *Cryptocodinium cohnii*. J. Biotech. 70, 185 – 192, 1999). Thraustochytriden sind pilzliche Protisten, die bis zu 50 % ihrer Lipide als DHA produzieren und im Cytoplasma in Form von Öltröpfchen ablagern (Lewis, T.E., Nichols, P.D., McMeekin, T.A.: The biotechnological potential of thraustochytrids, Mar. Biotechnol. 1, 580 – 587 1999). Marine Bakterien inkorporieren im Gegensatz dazu die polyungesättigten Fettsäuren in Membranphospholipide. Der Gehalt an EPA in den Gesamtlipiden von *Colwellia psychrerythraea* liegt bei 6-7 % (Bowman, J.P., Gosink, J.J., McCammon, S.A., Lewis, T.T., Nichols, D.S., Skerratt, J.H., Rea, S.M., McMeekin, T.A.: *Colwellia demingae* sp. nov., *Colwellia hornerae* sp. nov., *Colwellia rossensis* sp. nov. and *Colwellia psychrotropica* sp. nov.: psychrophilic Antarctic species with the ability to synthesise docosahexaenoic acid (22:6 n-3), Int. J. Syst. Bacteriol. 48, 1171 – 1180, 1997).

Linol- und α -Linolensäure sind als essentielle Fettsäuren für die menschliche Ernährung unersetzlich. Arachidonsäure ist Vorstufe der physiologisch wichtigen Eicosanoide. EPA und DHA (Omega-3-Fettsäuren) sind nicht nur für die frühkindliche Gehirnentwicklung notwendig, sondern besitzen auch prophylaktischen/therapeutischen Nutzen bei Herz-Kreislauf-Krankheiten, rheumatischen Erkrankungen, chronisch-entzündlichen

Darmerkrankungen, Neurodermitis, Psoriasis und Allergien. Es ist z.B. nachgewiesen, dass das Sterberisiko von Patienten nach einem bereits erlittenen Herzinfarkt durch tägliche Einnahme von Omega-3-Fettsäuren signifikant erniedrigt wird (GISSI-Studie). Von besonderem Interesse sind strukturell ungewöhnliche Fettsäuren, die über weitere biologische Eigenschaften verfügen. Die Hydroxyfettsäuren Coriolsäure (13-HODE *Z,E*) und α -Dimorphenecolsäure (9-HODE *E,Z*), die aus einer *Oscillatoria*-Art isoliert wurden, zeichnen sich ebenso wie α -Linolensäure durch antibakterielle Aktivität aus (Kreitlow, S.: Dissertation Greifswald 2000).

Zusätzlich zu den Fettsäuren sind die marinen Organismen auch durch ihren Reichtum an Proteinen, Vitaminen und Mineralstoffen von Interesse für Ernährung, Kosmetik und Medizin [Lindequist, U. and Th. Schweder: Marine Biotechnology, in: Biotechnology, 2. ed., Ed. H.-J. Rehm Wiley-VCH Weinheim 2001, pp. 442-473; Puls, O.: Biotechnology with cyanobacteria and microalgae, in: Biotechnology, 2. ed., Ed. H.-J. Rehm Wiley-VCH Weinheim 2001, pp. 105-136, Becker, Microalgae: Biotechnology and Microbiology, Cambridge, 1994; Köhler, Kurth, Pulz, *Spirulina platensis*-an microalgal additiv for cosmetics, Biotechnology for Microalgae, 1997).

Für die Herstellung und Anwendung von Extrakten aus Algen und die Anwendung von Algenbiomasse in den Bereichen Ernährung, Kosmetik und Medizin wurden Patente angemeldet (z. B. US 4320050, IL 59766, DE 10059107A). Auch wurden spezielle Kombinationen von Fibrillin mit Blaualgenextrakten in der Kosmetik und Medizin beschrieben (WO 0107006). Weitere Patente beziehen sich auf die Produktion von polyungesättigten Fettsäuren durch marine Organismen (z.B. Barclay, W.R. (1992) Process for the heterotrophic production of microbial oils with high concentrations of omega-3 highly unsaturated fatty acids, U.S. Patent 5 130 242; Barclay, W.R. (1994) Process for growing *Thraustochytrium* and *Schizochytrium* using non-chloride salts to produce a micro-floral biomass having omega-3 highly unsaturated fatty acids, U.S. Patent 5 340 742).

Die Verwendung der lipidhaltigen Biomasse von marinen Organismen als Wirkstoffträger wurde bisher nicht beschrieben.

Bei der Herstellung von Nano- und Mikropartikeln sind verschiedene

Herstellungsverfahren auf Basis von Lipiden oder Polymeren bereits bekannt. So wurden bereits Verfahren zur Herstellung von Lipid-Mikropartikeln beschrieben auf Basis von Phospholipiden, die antimykotische Eigenschaften haben und im pharmazeutischen oder kosmetischen Bereich eingesetzt werden können (DE 69002905T2). Andere Verfahren beschreiben Lipidnanopartikeln auf Basis von extrahierten Mono-, Di und Triglyceriden, Ölen oder Wachsen. Mit Hilfe dieser gewonnenen Lipide werden ebenfalls pharmazeutische Wirkstoffe verkapselt (WO94/20072). Weitere Lipidnanopartikeln beschreiben Substanzen ebenfalls auf Basis von Lipiden zur parenteralen Anwendung (WO98/56362). Auch werden spezielle Techniken zur Herstellung von Lipidnanopartikeln vorgestellt (z. B. EP 526666). Bisher sind in der Literatur jedoch keine lipidhaltigen Mikro- und Nanopartikeln auf Basis mariner Organismen (Mikro- und Makroalgen, Thraustochytriden, marine Bakterien) und deren Herstellung beschrieben worden.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, Verfahren zur Herstellung von Wirkstoffträgern zu entwickeln, durch die Biomassen aus marinen Organismen (Mikro- und Makroalgen, Thraustochytriden, marine Bakterien) auf kostengünstigem direkten Weg zu neuartigen Substanzen umgesetzt werden, die dem oben genannten Stand der Technik überlegen sind und spezielle Wirkungen aufweisen. Aufgabe der Erfindung ist es insbesondere, die gesundheitsfördernden Inhaltstoffe der lipidhaltigen marinen Organismen besonders effizient zu nutzen und verschiedene Anwendungen zu ermöglichen, die mit den nativen Biomassen nicht erreicht werden können.

Erfindungsgemäß wurde diese Aufgabe durch Verfahren nach folgenden Prinzipien gelöst, die zu Produkten führen, die auf bekannten Wegen nicht erreicht werden können.

1. Homogenisationsverfahren

Die Lipidhaltigen marinen Mikroorganismen werden zunächst erwärmt, so dass eine Verflüssigung der darin enthaltenen Fettsäuren erreicht wird. In diese Biomasse werden ein oder mehrere Wirkstoffe (fest oder flüssig) hinzugegeben (Abb. 1). Der Wirkstoff wird in den Fettsäuren der Cyanobakterien bzw. der gesamten

Lipidhaltigen marinen Mikroorganismen suspendiert, dispergiert bzw. adsorbiert. Parallel dazu wird ein Tensid-Wasser-Gemisch hergestellt. Dieses Tensid-Wasser-Gemisch wird auf eine Temperatur oberhalb der Schmelztemperatur der Fettsäuren erwärmt. Die beiden Phasen werden bei der gewählten Temperatur vereint. Anschließend wird mit Hilfe eines Rührers (Rotor-Stator-Prinzip) oder mit Hilfe von Ultraschall eine Vorsuspension hergestellt. Die Vorsuspension wird danach mit Hilfe eines Hochdruckhomogenisators homogenisiert, wobei die Zahl der Homogenisationszyklen und der Arbeitsdruck nach der erwünschten Partikelgröße und Stabilität der Zubereitung gewählt werden. Zwischen den einzelnen Zyklen ist darauf zu achten, dass die Herstellungstemperatur immer wieder eingestellt wird. Das Tensid dient zur Stabilisierung der Suspension.

Sollte es bei der Herstellung Probleme mit der Höhe der Temperatur (z. B. empfindliche Wirkstoffe) geben, so besteht die Möglichkeit, das gesamte Verfahren auch bei Raumtemperatur durchzuführen. In diesem Falle wird das Verfahren in gleicher Weise, wie zuvor beschrieben, durchgeführt, wobei der Wirkstoff an den Lipidhaltigen marinen Mikroorganismen adsorbiert oder bei Zusatz einer geringen Wassermenge dispergiert wird.

2. Lösungsmittel-Homogenisations-Verfahren

Die Lipidhaltigen marinen Mikroorganismen und der Wirkstoff werden in einem verdampfbaren organischen Lösungsmittel suspendiert. Danach wird dieses Gemisch vordispergiert (Stator-Rotor-Prinzip oder Ultraschall), homogenisiert (Hochdruckhomogenisator) und anschließend sprühgetrocknet oder gefriergetrocknet (Abb. 2). Beim Gefrier Trocknen ist zu beachten, dass geeignete Kryoprotektoren eingesetzt werden. Es besteht darüber hinaus auch die Möglichkeit, das organische Lösungsmittel, durch geeignete Verdampfer (z. B. Rotationsverdampfer) zu entfernen. Anschließend können die Partikeln aus lipidhaltigen marinen Mikroorganismen in geeigneten wässrigen Tensid-Lösungen redispergiert werden. Danach ist eine erneute Dispergierung (Stator-Rotor-Prinzip oder Ultraschall) und Homogenisierung (Hochdruckhomogenisator) notwendig.

3. Lösungsmittel-Emulsions-Verfahren

Dieses Verfahren basiert auf der Bereitung einer Emulsion aus Wasser und einer Lösung der Algenbiomasse-Wirkstoff in einem geeigneten organischen Lösungsmittel (Abb. 3). Dazu wird ein Emulgator zur Dispergierung des Algenbiomasse-Wirkstoffes eingesetzt. Emulgator und Algenbiomasse werden in einem geeigneten organischen Lösungsmittel gelöst. Zu dieser Lösung wird eine wässrige Phase, die ein wasserlösliches Cotensid enthält, hinzugefügt. Danach wird dieses Gemisch vordispersiert (Stator-Rotor-Prinzip oder Ultraschall). Nach einem Homogenisationsschritt mit Hilfe eines Hochdruckhomogenisators wird das organische Lösungsmittel durch Verdampfen entfernt, wobei die Wirkstoff enthaltende Biomasse in Form von festen Partikeln ausfällt.

Die Anwendung dieser Verfahren führt zu neuartigen marine Biomasse-Wirkstoff-Partikeln mit einem mittleren Durchmesser, der je nach Herstellungsart zwischen 10 nm und 10 µm liegt.

Spezielle Eigenschaften werden erreicht, wenn in den nach Anspruch 1 hergestellten Mikro- und Nanopartikel Aggregaten aus den lipidhaltigen marinen Organismen und Tonmineralien (Phytosilikate) enthalten sind. Spezielle Charakteristika dieser Mikro- und Nanopartikel sind ihre große Oberfläche, ihr hohes Ionenaustauschvermögen, ihre große Quellfähigkeit und ihre Fähigkeit, in die Schichten der Silikatstruktur die unterschiedlichsten Wirkstoffe einzulagern. Überraschenderweise wurde gefunden, dass die auf diese Weise hergestellten Aggregate das Zellwachstum deutlich begünstigen.

Vorteilhaft ist insbesondere die Verwendung von Tonen, die in ihrer Kristallstruktur dem Bentonit entsprechen. Bentonit weist nicht nur einen sehr hohen Anteil von Partikel mit einer Größe $< 2 \mu\text{m}$ auf, sondern besitzt auch eine hohe Ionenaustausch Kapazität von 0,76 meq/g, eine extrem große spezifische Oberfläche von $562 \text{ m}^2/\text{g}$ und den stärksten Einfluß auf das Wachstum von Amnion-Epithelzellen.

Eine besonders vorteilhafte Ausführungsform der Erfindung ist die Verwendung von lipidhaltigen marinen Organismen, die in Gegenwart von Tonmineralien kultiviert wurden. Auf grund der großen spezifischen Oberfläche sind auf dieser Basis hergestellte Mikro- und Nanopartikel als Wirkstoffträger herragend geeignet, zumal die Wirkstoffabgabe durch den Anteil und die Zusammensetzung der mineralischen Komponente sehr gut gesteuert werden kann.

Die vorgestellten Prinzipien sind geeignet, verschiedene pflegende Komponenten und/oder Mineralstoffe und/oder Vitamine und/oder Nahrungsergänzungsstoffe in Biomassen zu einzulagern. Auf diese Weise ist es möglich, in der Kosmetik die wertvollen Inhaltsstoffe der Algen wie Proteine, Mineralien und Vitaminen, mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie γ -Linolensäure, Arachidonsäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure in besonders günstiger Form zu nutzen.

Zusätzlich können erfindungsgemäß ein oder mehrere pharmazeutische Wirkstoffe in die Mikro- und Nanopartikel inkorporiert werden. Die erfindungsgemäße Herstellung hat den Vorteil, dass die Freisetzung der inkorporierten Substanzen durch Wahl der Temperatur, der Wirkstoffe, des Tonmineralanteils und der Tenside gesteuert werden kann. Erfindungsgemäß ist es vorteilhaft, die Teilchen in destilliertem Wasser oder in einem wässrigen Medium mit Zusätzen wie Elektrolyten, Polyonen, Mono-, Di- und Polysacchariden, Isotonisierungsmitteln, Puffersubstanzen, Gefrierschutzmitteln und Konservierungsmitteln zu dispergieren. Um den erfindungsgemäßen Zweck zu erreichen, kann ein Zusatz von einem oder mehreren dispersionsstabilisierenden Substanzen notwendig sein. Eine vorteilhafte Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass der Biomasse ein oder mehrere Wirkstoffe, Vitamine oder Nahrungsergänzungsstoffe in fester und/ oder flüssiger Form zugesetzt werden. Zweckmäßig ist es, die zugesetzten Wirkstoffe in den Fettsäuren der Biomasse zu suspendieren, zu dispergieren oder zu adsorbieren. Erfindungsgemäß wird die Biomasse in einem weiteren Herstellungsschritt mit einem Tensid-Wasser-Gemisch vereinigt. Zweckmäßig ist es, zunächst mit Hilfe eines Rührers (Rotor-Stator-Prinzip) oder mit Hilfe von Ultraschall eine Vorsuspension herzustellen. Erfindungsgemäß wird diese Vorsuspension danach mit Hilfe eines Hochdruckhomogenisators homogenisiert, wobei die Zahl der Homogenisationszyklen und der Arbeitsdruck nach der dem erfinderischen Zweck entsprechenden Partikelgröße und Stabilität der Zubereitung gewählt werden.

Bei einem anderen, ebenfalls erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren werden Biomasse und Wirkstoffe in einem verdampfenden organischen Lösungsmittel suspendiert. Danach wird dieses Gemisch vordispersiert (Stator-Rotor-Prinzip oder Ultraschall) und homogenisiert (Hochdruckhomogenisator). Anschließend wird das

Lösungsmittel durch Sprühtrocknung oder Gefriertrocknung oder mittels Rotationsverdampfer entfernt. Falls erforderlich kann die Biomasse in geeigneten wässrigen Tensid-Lösungen redispergiert und danach nachdispergiert (Stator-Rotor-Prinzip oder Ultraschall) und anschließend homogenisiert (Hochdruckhomogenisator) werden. Falls erforderlich, kann ein Coemulgator bzw. ein Emulgator zur Dispergierung des Biomasse-Wirkstoffes-Mischung eingesetzt werden.

Die nach den beschriebenen Verfahren hergestellten Mikro und Nanopartikel ermöglichen eine Verwendung auf den verschiedensten Gebieten. Überraschenderweise zeigte sich eine deutlich bessere Bioverfügbarkeit der neuartigen Substanzen gegenüber den reinen Stoffen. Das ermöglicht die Verwendung der Partikeln als pflegende Komponenten in kosmetischen Produkten, allein oder in Kombination mit anderen Pflegeprodukten. Die neuen Substanzen können problemlos in andere Pflegekomplexgrundlagen eingearbeitet werden. Die erfindungsgemäßen Formulierungen machen die Haut besonders geschmeidig und pflegen sie. Wie Fettemulsionen zeigen die Partikeln nur eine geringe systemische Toxizität und kaum Zytotoxizität.

Völlig überraschend wurde gefunden, dass Extrakte der Biomasse antibakterielle Effekte zeigen und in vitro sogar das Wachstum der multiresistenten Staphylokokken deutlich reduzierten. Nach Umwandlung in Mikro- und Nanopartikel unterstützen die Inhaltstoffe der marinen Organismen die natürliche Abwehrbarriere der Haut. Die Bindung einer pathogenen Mikrobe an einen Rezeptor des Wirtes ist der kritische frühe Schritt in einer Entwicklung zu einer Kolonisation bzw. Infektion. Bereits dieser frühe Schritt kann überraschenderweise durch die erfindungsgemäßen Formulierungen beeinflusst werden.

Zahlreiche lipidhaltige marine Organismen enthalten Substanzen, die als unspezifische Immunstimulantien wirken können, d. h. sie stimulieren Leukozyten und wirken als Aktivatoren des Retikuloendothelialen Systems. Nach der erfindungsgemäßen Umwandlung der Biomasse dieser Organismen in Mikro- oder Nanopartikel ermöglichen diese Inhaltstoffe weitere Anwendungen. Vorteilhaft ist beispielsweise ein Einsatz in Abdeckmaterialien zur Wundversorgung. Erfindungsgemäß mit Antibiotika dotierte Mikro- und Nanopartikel erlauben eine gesteuerte Freisetzung der antimikrobiellen Wirkstoffe und eine gleichzeitige Immunstimulation. Vorteilhafterweise können diese

Mikro- und Nanopartikel zusätzlich mit anorganischen Thiocyanaten oder Hydrothiocyanaten organischer Basen dotiert werden.

Neben der Anwendung in kosmetischen Produkten sind auch Anwendungen im diätischen und lebensmitteltechnologischen Bereich erfindungsgemäß. Der große Reichtum lipophiler mariner Organismen an wertvollen Inhaltsstoffen ermöglicht nach erfindungsgemäßer Umwandlung zu Mikro- und Nanopartikel eine gezielte Substituierung von Mangelzuständen. Fette, Vitamine, Mineralstoffe und andere wertvolle Inhaltsstoffe der marinen Organismen können nach Umwandlung in Mikro- und Nanopartikel durch den Säugetierorganismus besser genutzt werden. Eine Anreicherung mit Nahrungsergänzungstoffen ist bei Anwendung der erfindungsgemäßen Verfahren problemlos möglich. Folgende Gruppen mariner Organismen verfügen über Inhaltsstoffe, die nur in diesen in geeigneter Zusammensetzung und Konzentration vorkommen und die über die erfindungsgemäße Umwandlung in Mikro- und Nanopartikel einer Nutzung zugeführt werden können:

- *Cyanobakterien der Klasse Oscillatoriales unter besonderer Berücksichtigung der Stämme SPH 03, SPH 04, SPH 05, SPH 06, SPH 09, SPH 10, SPH 11, SPH 12, SPH 13, SPH 14, SPH 20, SPH 21, SPH 22, SPH 23, SPH 25, SPH 26, SPH 29, SPH 32, SPH 34, SPH 37, der Klasse Nostocales unter besonderer Berücksichtigung der Stämme SPH 18, SPH 20, SPH 27, SPH 28, SPH 38, der Klasse Choococcales unter besonderer Berücksichtigung der Stämme SPH 07a, SPH 07b, SPH 08, SPH 14, SPH 16, SPH 17, SPH 24, SPH 33, SPH 36, SPH 39, SPH 40, SPH 43 und der Klasse Stigonematales.

- *Makroalgen der Gattungen Asparagopsis, Cystoseira, Codium, Dictyota, Dictyopteris, Enteromorpha, Fucus, Gelidium, Gracilaria, Gracilariopsis, Halopteris, Hypoglossum, Laurencia, Plocamium, Polyneura, Sargassum, Solieria, Ulva,

- *Thraustochytriden der Gattungen Schizochytrium und Thraustochytrium

- *marine Bakterien der Gattungen Photobacterium, Shewanella und Colwellia.

Besonders vorteilhaft ist, dass die Partikeln mittels Rührwerken (Rotor-Stator-Prinzip) und Hochdruckhomogenisation hergestellt werden können, die seit Jahrzehnten zur Herstellung von Fettemulsionen zur parenteralen Ernährung genutzt und daher für eine Produktion von Biomassepartikeln in industriellem Maßstab zur Verfügung stehen. Sie

sind von den staatlichen Behörden zur Herstellung von Parenteralia akzeptiert und bedürfen daher keiner neuen aufwendigen Zulassungsverfahren.

Die erfindungsgemäße Umwandlung von Biomassen aus lipidhaltigen marinen Organismen ermöglicht darüber hinaus weitere Anwendungen. Die Lipide binden an Kunststoffoberflächen. Das ermöglicht den Einsatz der erfindungsgemäß dotierten Mikro- und Nanopartikel lipidhaltiger mariner Organismen in Slow-release-Systemen zur Prävention implantat-assoziierten Infektionen, vorzugsweise von katheter-assoziierten Infektionen. Die feste Biomatrix ermöglicht den Schutz des inkorporierten Wirkstoffs vor chemischer Zersetzung und eine verzögerte Freigabe des Pharmakons. Durch Wahl geeigneter Tenside und Wirkstoffe ist aber auch eine beschleunigte Freisetzung der Wirkstoffe von der Partikeloberfläche möglich, wenn diese an der Oberfläche gelagert werden, so dass eine gesteuerte Wirkstofffreigabeerfindungsgemäß ist. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Sterilisation von mit den erfindungsgemäßen Mikro- und Nanopartikeln dotierten Materialien.

Im Gegensatz zu Polymernanopartikeln sind die neuartigen Partikeln aus mariner Biomasse bioabbaubar.

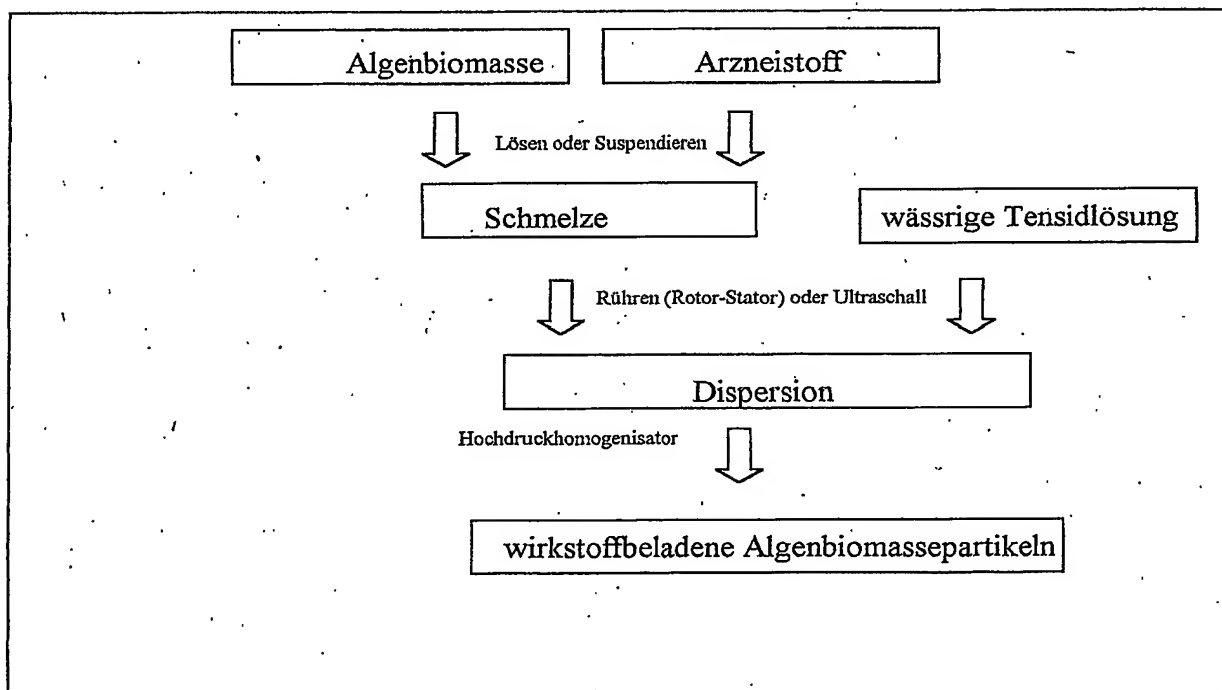


Abb. 1 Schema des Herstellungsprozesses von wirkstoffbeladenen Algenbiomassepartikeln (Homogenisationsprinzip)

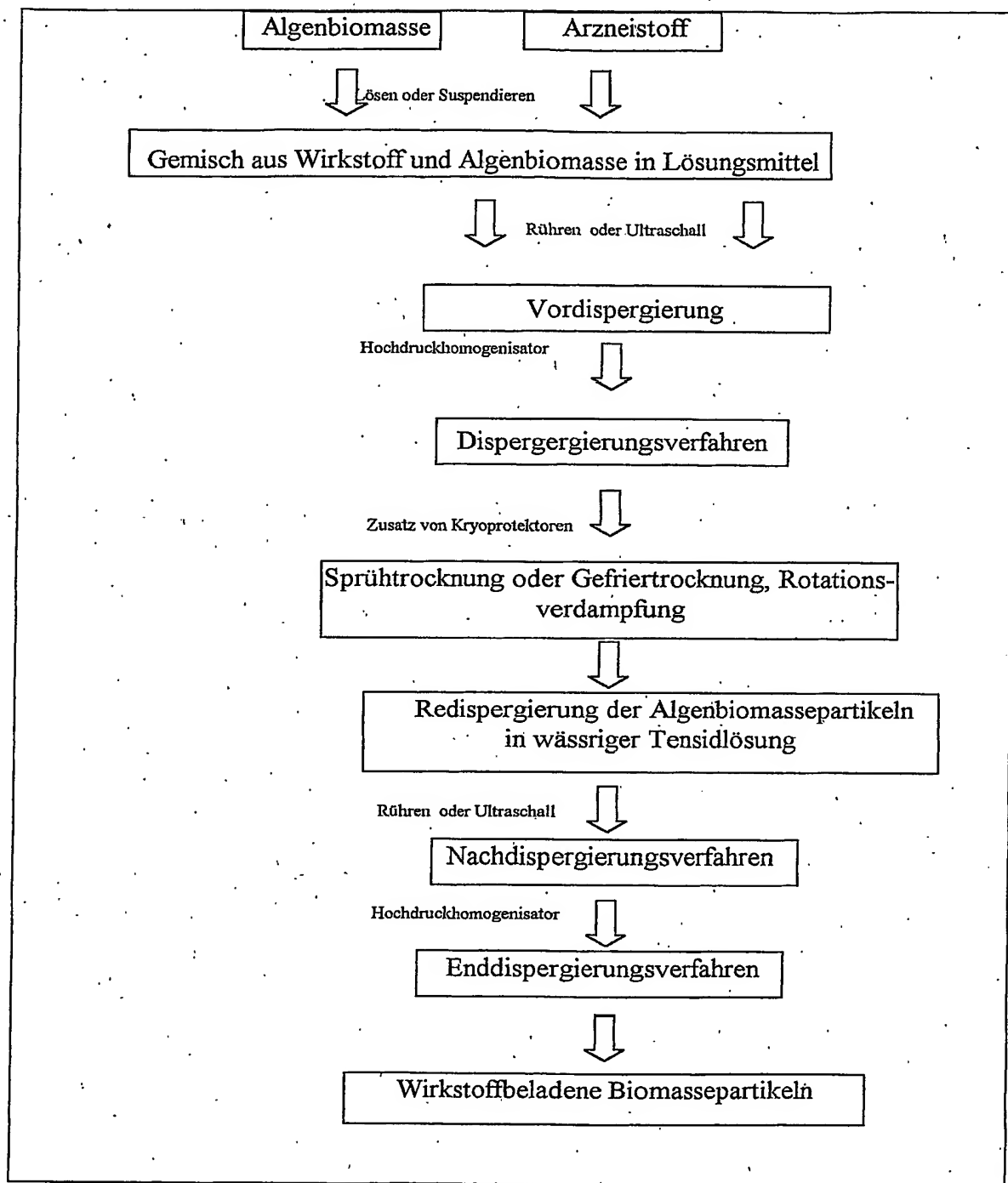


Abb. 2 Schema des Herstellungsprozesses von Biomassenpartikeln (Lösungsmittel-Homogenisations-Verfahren)

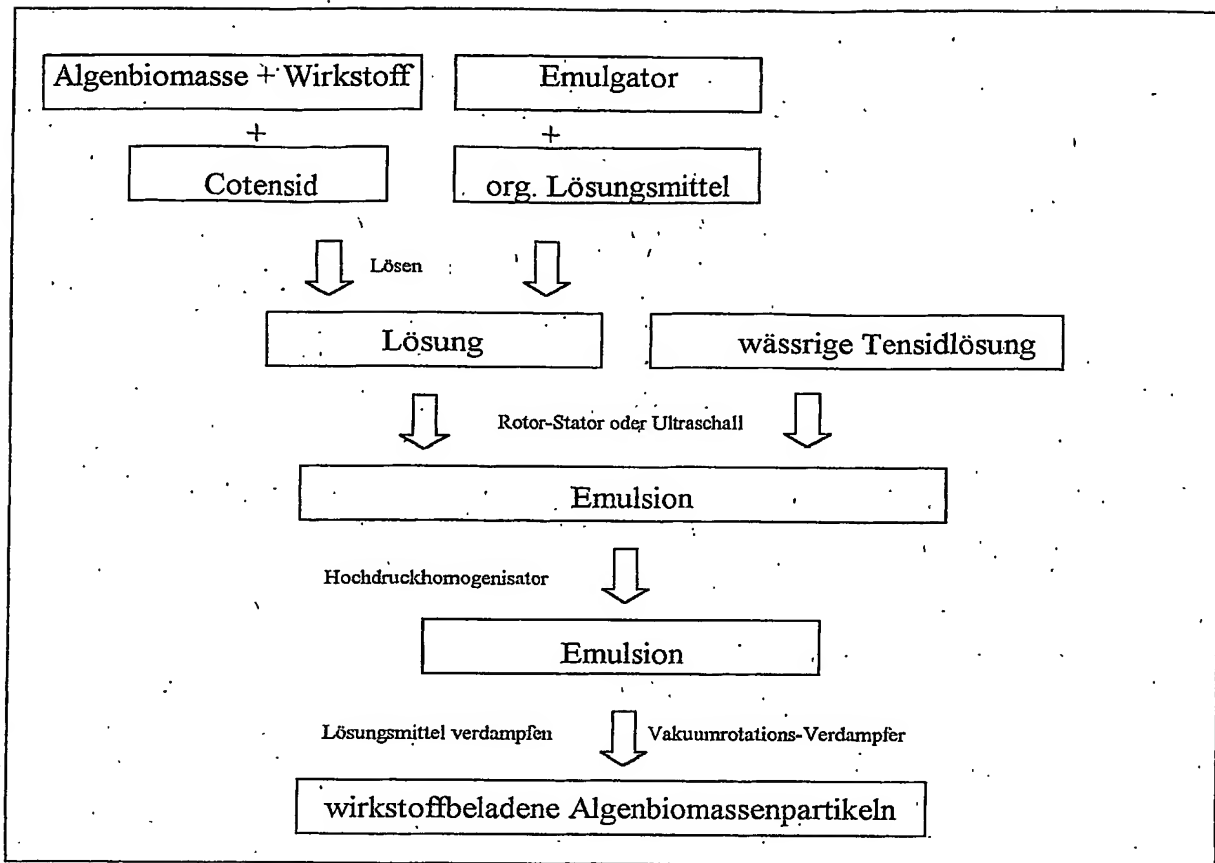


Abb. 3 Schema des Herstellungsprozesses nach dem Lösungsmittel-Emulsions-Verfahren

Beispiele

Beispiel 1 Herstellung von Ubichinon Q1 – Algenbiomasse - Partikeln

Rezeptur der Ubichinon – Algenbiomasse - Partikeln

Stoff	Menge in g
Wirkstoff (Ubichinon Q1)	0,05
Algenbiomasse	5,00
Emulgator (Plantacare 2000)	0,05
Demineralisiertes Wasser	45,00
Homogenisationszyklen	4

Die Algenbiomasse wird auf eine Temperatur von 50 °C erwärmt und anschließend der verwendete Wirkstoff Ubichinon Q1 darin dispergiert bzw. gelöst. Davon getrennt wird eine wässrige Emulgatorlösung auf die entsprechende Temperatur (50 °C) erwärmt. Danach werden beide Phasen bei der gewünschten Homogenisierungstemperatur vereint. Anschließend wird das Gemisch mit Hilfe eines Ultra Turrax T25 der Fa. Janke und Kunkel GmbH & Co KG (Staufen, Deutschland) in einem Emulgierungsprozess bei 8000 Umdrehungen pro Minute und einer Dauer von 30 Sekunden verarbeitet.

Die Suspension wird danach mit einem Kolbspalt-Hochdruckhomogenisator Micron Lab 40 (APV-Gaulin, Lübeck) bei einem Druck von 500 bar und einer Temperatur von 50 °C vier mal homogenisiert.

Beispiel 2

Tabelle 1: Rezepturbeispiele Einarbeitung von DNA in Algenbiomasse

Stoff	Rezeptur 1	Rezeptur 2	Rezeptur 3
Wirkstoff (DNA)	5 %	10 %	15 %
Algenbiomasse- grundlage	5,00 g Cyanobakterien	5,00 g Cyanobakterien	5,00 g Cyanobakterien
Emulgator	0,60 g Plantacare®	1,25 g Pluronic® F- 68	0,60 g Miranol Ultra 32
Demineralisiertes Wasser	45,00 g	45,00 g	45,00 g
Homogenisationszyklen	4	3	3

Bei der Inkorporation der DNS in Algenbiomasse-Partikeln werden die Herstellungsparameter leicht variiert, um einer Zerstörung der DNS entgegenzuwirken:

- Vorhomogenisation mit dem Ultra-Turrax: 30 sec
- Homogenisationstemperatur: 55°C
- Homogenisationsdruck: 500 bar
- Zahl der Homogenisationszyklen: 2

Dabei wird die DNS einmal in getrockneter Form nach Lyophilisation in der Algenbiomasse dispergiert und homogenisiert. Zum anderen wird die in Wasser gelöste DNS einfach zur wässrigen Emulgatorlösung hinzugegeben und mit dieser zusammen in der erwärmten Algenbiomasse verteilt, woran sich dann ebenfalls die Homogenisation anschließt.

*Beispiel 3: Herstellung von Triamcinolon-Algebiomasse-Mikropartikeln
(Lösungsmittel-Emulsionsverfahren)*

Wasser	45,00 g gereinigtes, filtriertes Wasser
organisches Lösungsmittel	7,50 g Dichlormethan
Algenbiomasse	1,12 g Cyanobakterien (15 % bezogen auf Dichlormethan)
Triamcinolon	0,12 g Triamcinolon
lipophiler Emulgator	0,38 g Epikuron® 170 (5 % bezogen auf Dichlormethan)
Cotensid	0,11 g Pluronic® F-68 (1,5 % bezogen auf Dichlormethan)

Die Herstellung der *Triamcinolon-Cyanobakterien-Mikropartikeln* basiert auf der Bereitung einer Emulsion aus Wasser und einer Lösung der Cyanobakterien mit dem Wirkstoff Triamcinolon in dem Lösungsmittel Dichlormethan. Nach einem Homogenisationsschritt wird das organische Lösungsmittel (Dichlormethan) durch Verdampfen entfernt, wobei die Algenbiomasse in Form von festen Nanopartikeln ausfällt. Die Stabilisierung der Emulsion bzw. Dispersion erfolgt durch ein geeignetes Tensidgemisch (Pluronic® F-68).

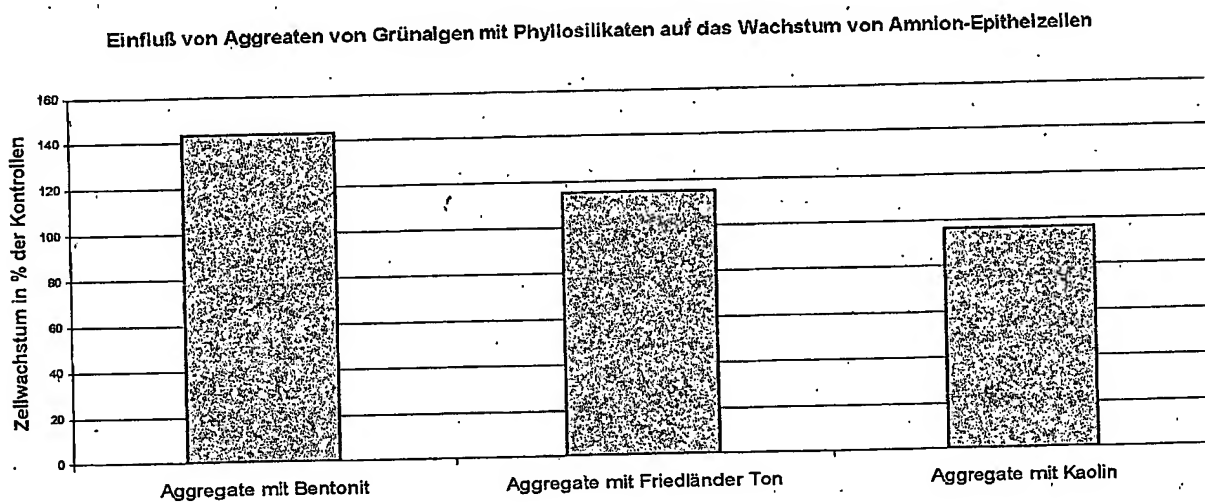
Als Geräte werden ein Ultra-Turrax T25 der Firma Janke & Kunkel GmbH & Co KG (Staufen/ Deutschland), sowie ein Kolben-Spalt-Homogenisator Micron Lab 40 der Firma APV Gaulin (Lübeck/ Deutschland) mit 7 Zyklen und bei 800 bar eingesetzt. Zusätzlich wird ein Rotationsverdampfer Rotavapor R114 mit einem angeschlossenen Vakuumsystem B178 der Firma Büchi (Fläwil/ Schweiz) bei einem Druck von 0,7 bar 60 min lang verwendet.

Beispiel 4 Einfluß von Mikro-und Nanopartikel mit Aggregaten aus lipidhaltigen marinen Organismen und Tonmineralien auf das Wachstum von Amnion-Epithelzellen.

Cyanophyceae wurden bis zu 2 Monate mit Zusätzen von Bentonit, Friedländer Ton und Kaolin kultiviert. Bereits nach kurzer Inkubationszeit bilden sich Aggregate, während bei den Kontrollen ohne mineralische Zusätze diese erst nach 2 Monaten und im geringeren Umfang gebildet werden. Das Mineral mit der höchsten Absorptionsfähigkeit (Bentonit) zeigt eine geringere Tendenz zur Bildung der Aggregate als Kaolin mit einer geringen Absorptionsfähigkeit. Durch die Wahl der mineralischen Komponenten kann die

Aggregatbildung und die Absorptionsfähigkeit der gebildeten Aggregate gesteuert werden. Die Aggregate wurden anschließend mit Hilfe eines Ultra Turrax T25 der Fa. Janke und Kunkel GmbH & Co KG (Staufen, Deutschland) in einem Emulgierungsprozess bei 8000 Umdrehungen pro Minute und einer Dauer von 30 Sekunden verarbeitet.

Bei einer Einwirkung auf FL-Zellen verstärken insbesondere Aggregate mit Bentonit das Zellwachstum signifikant ($p = <0,001$). Die Beeinflussung ist deutlich stärker als die Wachstumsförderung durch Friedländer Ton ($p = 0,024$). Der Einfluß von Kaolin ist dagegen nicht signifikant ($p = 0,2786$).



Patentansprüche

1. Partikeln aus nachwachsenden lipidhaltigen marinen Organismen, dadurch gekennzeichnet, dass diese einen mittleren Durchmesser von 10 nm – 10 µm aufweisen.
2. Partikeln aus mariner Biomasse (Mikro- und Makroalgen, Thraustochytriden, marine Bakterien), nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich Tonminerale (Phyllosilikaten) mit einem Durchmesser < 2 µm enthalten sind.
3. Partikeln aus mariner Biomasse (Mikro- und Makroalgen, Thraustochytriden, marine Bakterien), nach Anspruch 1 und 2 dadurch gekennzeichnet, dass Partikeln aus nachwachsenden lipidhaltigen marinen Organismen pflegende Komponenten und/oder Mineralstoffe und/oder Vitamine und/oder Nahrungsergänzungsmittel enthalten.
4. Partikeln aus nachwachsenden lipidhaltigen marinen Organismen nach Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere pharmazeutische Wirkstoffe inkorporiert wurden.
5. Partikeln aus nachwachsenden lipidhaltigen marinen Organismen nach Anspruch 1 – 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Freisetzung durch Wahl der Temperatur, der Wirkstoffe und der Tenside gesteuert werden kann.
6. Partikeln aus nachwachsenden lipidhaltigen marinen Organismen nach Ansprüchen 1-5, dadurch gekennzeichnet, dass die Teilchen in destilliertem Wasser oder in einem wässrigen Medium mit Zusätzen wie Elektrolyten, Polymeren, Mono-, Di- und Polysacchariden, Isotonisierungsmitteln, Puffersubstanzen, Gefrierschutzmitteln und Konservierungsmitteln dispergiert sind.
7. Partikeln aus nachwachsenden lipidhaltigen marinen Organismen nach Ansprüchen 1-6, dadurch gekennzeichnet, dass die Partikeln einen oder mehrere dispersionsstabilisierende Substanzen enthalten.
8. Verfahren zur Herstellung von Partikeln aus nachwachsenden lipidhaltigen marinen Organismen, dadurch gekennzeichnet, dass im ersten Schritt in die

- Biomasse ein oder mehrere Wirkstoffe, Vitamine oder Nahrungsergänzungsstoffe (fest oder flüssig) hinzugegeben werden.
9. Verfahren zur Herstellung von Partikeln aus nachwachsenden lipidhaltigen marinen Organismen, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausgangsstoffe durch Kultivierung der marinen Organismen unter Zusatz von Tonmineralien erhältlich sind.
 10. Verfahren zur Herstellung von Partikeln aus nachwachsenden lipidhaltigen marinen Organismen, nach Anspruch 8 und/oder 9 dadurch gekennzeichnet, dass dieser Wirkstoff in den Fettsäuren der Biomasse suspendiert, dispergiert oder adsorbiert wird.
 11. Verfahren zur Herstellung von Partikeln aus nachwachsenden lipidhaltigen marinen Organismen, nach Anspruch 7 und 8 dadurch gekennzeichnet, dass die Biomasse in einem weiteren Herstellungsschritt mit einem Tensid-Wasser-Gemisch vereinigt wird.
 12. Verfahren zur Herstellung von Partikeln aus nachwachsenden lipidhaltigen marinen Organismen, nach Anspruch 8-11 dadurch gekennzeichnet, dass die beiden Phasen bei der gewählten Temperatur vereint werden und anschließend mit Hilfe eines Rührers (Rotor-Stator-Prinzip) oder mit Hilfe von Ultraschall eine Vorsuspension hergestellt wird.
 13. Verfahren zur Herstellung von von Partikeln aus nachwachsenden lipidhaltigen marinen Organismen, nach Anspruch 8-12, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorsuspension danach mit Hilfe eines Hochdruckhomogenisators homogenisiert wird, wobei die Zahl der Homogenisationszyklen und der Arbeitsdruck nach der erwünschten Partikelgröße und Stabilität der Zubereitung gewählt werden.
 14. Verfahren zur Herstellung von Partikeln aus nachwachsenden lipidhaltigen marinen Organismen, nach Anspruch 8-13, dadurch gekennzeichnet, dass die Biomasse und der Wirkstoff in einem verdampfaren organischen Lösungsmittel suspendiert werden.
 15. Verfahren zur Herstellung von Partikeln nachwachsenden lipidhaltigen marinen Organismen, nach Anspruch 8-14, dadurch gekennzeichnet, dass

- danach dieses Gemisch vordispersiert (Stator-Rotor-Prinzip oder Ultraschall), homogenisiert (Hochdruckhomogenisator) und anschließend das Lösungsmittel durch Sprühtrocknung oder Gefriertrocknung oder mittels Rotationsverdampfer entfernt wird.
16. Verfahren zur Herstellung von Partikeln aus nachwachsenden lipidhaltigen marinen Organismen, nach Anspruch 8-15, dadurch gekennzeichnet, dass die Biomassepartikeln in geeigneten wässrigen Tensid-Lösungen redispersiert werden.
 17. Verfahren zur Herstellung von Partikeln aus nachwachsenden lipidhaltigen marinen Organismen, nach Ansprüchen 8-16, dadurch gekennzeichnet, dass danach dieses Gemisch nachdispersiert (Stator-Rotor-Prinzip oder Ultraschall) und anschließend homogenisiert (Hochdruckhomogenisator) werden.
 18. Verfahren zur Herstellung von Partikeln aus nachwachsenden lipidhaltigen marinen Organismen, nach Anspruch 8-17, dadurch gekennzeichnet, dass die Bereitung einer Emulsion aus Wasser und einer Lösung der Biomasse-Wirkstoff Mischung in einem geeigneten organischen Lösungsmittel erfolgt, wobei ein Coemulgator bzw. ein Emulgator zur Dispersierung des Biomasse-Wirkstoffes-Mischung eingesetzt werden.
 19. Verfahren zur Herstellung von Partikeln aus nachwachsenden lipidhaltigen marinen Organismen nach Anspruch 8-18, dadurch gekennzeichnet, dass die Stabilisierung der Emulsion bzw. Dispersion durch ein geeignetes Tensidgemisch erfolgt.
 20. Verwendung der Partikeln aus nachwachsenden lipidhaltigen marinen Organismen nach Anspruch 1-19 dadurch gekennzeichnet, dass die Partikeln als pflegende Komponenten in kosmetischen Produkten allein oder in Kombination mit anderen Pflegeprodukten eingesetzt werden.
 21. Verwendung der Partikeln aus nachwachsenden lipidhaltigen marinen Organismen nach Anspruch 1-19 zur Verbesserung der natürlichen Barrierfunktion der Haut und/oder zur Veränderungen des Hautmilieus, durch welche nosokomial bedeutsame Anflugkeime in ihrer Bindung an

Rezeptoren auf der Haut oder auf Geweben und/oder in ihrem Wachstum behindert werden.

22. Verwendung der Partikeln nach Anspruch 1-20 als Antibiotikaträger, zur dosierten Freisetzung antimikrobiellen Wirkstoffe und gleichzeitiger Immunstimulation
23. Partikel nach Anspruch 1-22, dadurch gekennzeichnet dass sie anorganische Thiocyanate und/oder Hydrothiocyanate organischer Basen enthalten.
24. Verwendung der Partikeln aus nachwachsenden lipidhaltigen marinen Organismen, dadurch gekennzeichnet dass *Cyanobakterien der Klasse Oscillatoriales unter besonderer Berücksichtigung der Stämme SPH 03, SPH 04, SPH 05, SPH 06, SPH 09, SPH 10, SPH 11, SPH 12, SPH 13, SPH 14, SPH 20, SPH 21, SPH 22, SPH 23, SPH 25, SPH 26, SPH 29, SPH 32, SPH 34, SPH 37, der Klasse Nostocales unter besonderer Berücksichtigung der Stämme SPH 18, SPH 20, SPH 27, SPH 28, SPH 38, der Klasse Choococcales unter besonderer Berücksichtigung der Stämme SPH 07a, SPH 07b, SPH 08, SPH 14, SPH 16, SPH 17, SPH 24, SPH 33, SPH 36, SPH 39, SPH 40, SPH 43 und der Klasse Stigonematales, *Makroalgen der Gattungen Asparagopsis, Cystoseira, Codium, Dictyota, Dictyopteris, Enteromorpha, Fucus, Gelidium, Gracilaria, Gracilariopsis, Halopteris, Hypoglossum, Laurencia, Plocamium, Polyneura, Sargassum, Solieria, Ulva, *Thraustochytriden der Gattungen Schizochytrium und Thraustochytrium, *marine Bakterien der Gattungen Photobacterium, Shewanella und Colwellia als Ausgangsmaterial eingesetzt werden.
25. Verwendung der Partikeln aus nachwachsenden lipidhaltigen marinen Organismen nach Anspruch 1-19, dadurch gekennzeichnet, dass die Partikel zur gezielten Substituierung von Mangelzuständen eingesetzt werden.
26. Verwendung der Partikeln aus nachwachsenden lipidhaltigen marinen Organismen nach Anspruch 1-25 in Slow-release-Systemen zur Prävention Implantat-assoziiierter Infektionen.

27. Verwendung zur Ausrüstung von sterilisationspflichtigen Materialien auch
beim Einsatz empfindlicher Wirkstoffe.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.